

# スフェロイドをデザインする技術を用いた 1型糖尿病モデル膵島の作製



技術解説

小島 伸彦\*

Production of type 1 diabetes model islets by a design method  
for multicellular spheroid

Key Words : Multicellular spheroid, Type 1 diabetes, Pancreatic islet,  
Insulin, Hyaluronic acid

## はじめに

近年、医薬品開発の現場では Microphysiological system (MPS) を活用しようとする動きが活発になっている。“Physiological”という単語が示すように、MPS はこれまでのシャーレを使った平面培養に比べて、生体に近い環境を再現することで“生理学的性”を高めた培養システムである。例えば、肺胞上皮細胞に呼吸時のような機械的伸縮刺激を与えることができるデバイス<sup>1)</sup>や、肝小葉に生じる酸素濃度勾配を再現可能なデバイス<sup>2)</sup>が報告されている。さらには複数の臓器を連結して培養液を灌流させることで、臓器間相互作用の再現を試みるデバイスの開発も進められている<sup>3)</sup>。日本を含め世界の様々な会社から MPS が販売されているが、総じてデバイスの設計を工夫することによって生理学的性を高めている。

MPS に使用される細胞は、多くの場合デバイス内で平面培養される。しかし、肝細胞や膵島細胞は 3 次元的に培養することで代謝機能やホルモン分泌活性が向上することが知られており、3 次元培養による生理学的性の追求も重要である。シンプルな 3 次元培養の一つとして、数千個の細胞をボール状に凝集させた“多細胞スフェロイド”、あるいは単純に“スフェロイド”と呼ばれる組織の培養を挙げる

ことができる。本稿では我々が開発した“スフェロイドをデザインする技術”を紹介し、特にスフェロイドに細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) を充填する方法を活用した“1 型糖尿病モデル膵島”の作製技術について紹介する。

## 強制的な細胞凝集法

数千個の肝細胞を凝集させると組織化が起こり、表面が滑らかなスフェロイドと呼ばれる球状の組織が形成される。一般的にスフェロイドは丸底の 96 ウェルプレート (U 底プレート) やハンギングドロップ法によって作製されるが、細胞によっては接着力が弱く、スフェロイドを形成することができない。この問題を解決するために、我々は食品添加物 (増粘多糖類) としても知られるメチルセルロース (methylcellulose: MC) を分散した培地を使って、強制的に細胞を凝集させる技術を開発した<sup>4,5)</sup>。通常の方法ではスフェロイド形成が難しい低接着性の細胞、例えば骨髄組織をシリンジングすることによって得られる骨髄細胞 (ほとんどが血球細胞) であっても、MC 培地の膨潤力によって安定的にスフェロイドを作製できる<sup>6)</sup> (図 1)。

具体的なスフェロイド作製手順は次の通りである。培養プレート等に 3% 程度の MC 培地を入れ、静置して気泡を除いた後に、通常の培地に細胞を分散した細胞懸濁液を 1  $\mu$ l 程度吐出する。3% MC 培地は通常培地を直ちに吸収して膨潤する。これにより細胞は細胞懸濁液の中心方向へと強制的に集められ、凝集状態を形成する。互いに密着した細胞は、生物学的な細胞間接着を形成してスフェロイドとなる。数千個程度の細胞からなるスフェロイドであれば、MC 培地中で底面に沈むことはなく、浮かせたまま培養することができる。MC 培地は粘性が高いためにスフェロイドは移動することはなく、プレート



\* Nobuhiko KOJIMA

1974年1月生まれ  
大阪大学大学院 工学研究科 応用生物  
工学専攻 博士前期課程 (1998年)  
東京大学大学院 理学系研究科 生物化学  
専攻 博士後期課程 (2001年)  
現在、横浜市立大学大学院 生命ナノシ  
ステム科学研究科 生命環境システム科  
学専攻 准教授 博士 (理学)  
専門/組織工学 細胞生物学  
TEL : 045-787-2214  
FAX : 045-787-2413  
E-mail : nobuhiko@yokohama-cu.ac.jp

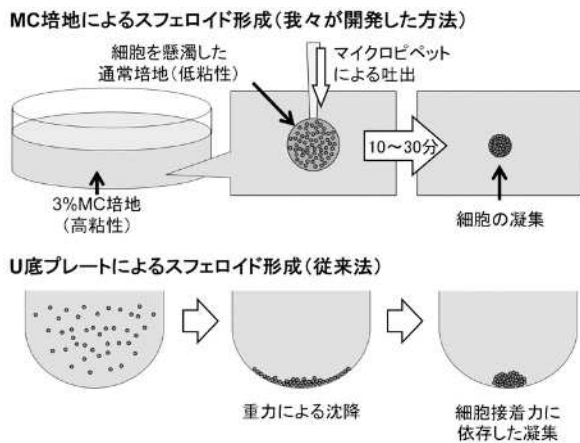


図1 スフェロイド形成法:MC培地による方法と従来法

に印をつけるといった簡単な工夫で、同じスフェロイドを連続的に観察することも可能である。U底プレートでは、一旦細胞が底面に沈殿したのちに、細胞同士の接着力・凝集力によって最終的にひとまとまりの凝集体が構築される。96ウェプレートのU底は湾曲が強くないため、重力の働きだけで細胞が一箇所に集まるわけではない点に注意が必要である。つまり、細胞同士が強く引き合うような細胞でなければスフェロイドを形成することができない(図1)。

細胞を凝集させてから24~48時間程度培養してスフェロイドが形成できると、MC培地から取り出すことができる。その際、3%MC培地は粘性が高いため工夫が必要となる。スフェロイドの数が少ない場合は、先端をカットしたチップを装着したマイクロピペットでスフェロイドを一つずつ吸引し、附着しているMC培地を通常培地等で洗い流す。数が多い場合、セルラーゼ溶液でMCを消化すれば粘性が低下し、効率よく分離・洗浄が可能である。取り出したスフェロイドは、低接着処理されたマルチウェルプレートによって通常培地で培養を継続することができる。増殖しない細胞であれば、1ヶ月以上培養を継続することも可能である。

この技術を活用するとスフェロイドを様々な“デザイン”することが可能となる(図2)。例えば、スフェロイドのサイズは吐出する細胞懸濁液の細胞密度を変えることで容易に制御することが可能である。細胞の接着力に関係なく凝集状態にできるため、接着力の異なる複数種類の細胞が混ざった状態でスフェロイドを作製すること、細胞だけでなく様々なサイズの粒状物質を混ぜ込むこと、小さなスフェロ

イド同士を凝集させて大きなスフェロイドをつくることも可能である<sup>4)</sup>。酵素で溶かすことのできるハイドロゲルビーズを混ぜ込むことによって、スフェロイドの内部に流路状の空間を作り込み、細胞密度を下げ、物質交換能を改善することもできる<sup>7)</sup>。

### スフェロイドへのECMの充填

ECMは細胞の足場として働く高分子状の物質である。化粧品などでよく知られているコラーゲンやヒアルロン酸は、それぞれアミノ酸や糖が繋がった高分子状のタンパク質あるいは多糖類である。ECMの組成や含有量は組織や臓器によって大きく変化し、細胞が正常に機能するための“場”を形作っている。細胞はECMの構成要素に対する受容体をもっていることが多く、例えばECMの一つであるフィブロネクチンにはRGD(アルギニン、グリシン、グルタミン酸)配列が存在し、細胞表面に存在するインテグリン分子がその配列を認識・結合することで、細胞外の環境情報を細胞内に伝達する<sup>8,9)</sup>。このように細胞にとって非常に重要な生理活性をもつECMを、MC培地を使ってスフェロイドの中に効率よく充填することができる<sup>10)</sup>。

ECMをスフェロイドに充填する工程は、MC培地を利用したスフェロイド作製と同時に行うことができる。すなわち、細胞懸濁液の中にECMを分散しておくことで、MC培地が膨潤するにつれ、培地に分散したECMも細胞と一緒に濃縮される(図2)。濃縮できるECMの分子量の下限はおおよそ250,000程度であり、分子量が40,000程度の物質はMC中を拡散する。分散するECMの種類や濃度によっては濃縮途中でゲル化してしまうが、あえてゲル化させることで細胞をゲル中にまばらに埋め込むことも可能である<sup>10)</sup>。

肝細胞や膵島細胞は、細胞間接着に依存して細胞機能が向上するため、ゲルの中に細胞が分散してい

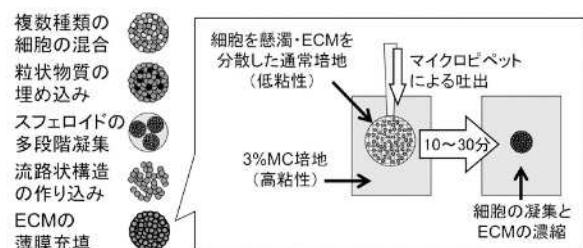


図2 MC培地によって可能となるスフェロイドデザイン

るような状態だと期待しているような細胞活性が得られない。細胞-細胞間相互作用と細胞-ECM間相互作用とのバランスが重要である。すなわち、ECM量は多くても少なくても不適切であり、ECMの効果が最も高くなる特異的な条件が存在する<sup>10)</sup>。

スフェロイドにECMを充填する方法として、従来法(U底プレート、ハンギングドロップ法)を用いることもできる。しかし、これらの方法では細胞は重力によってプレートあるいは液滴の下部に集まるが、ECMは熱運動によって培地中に均一に存在する。したがって、培地中に分散しているECMのうちスフェロイドの内部に寄与する割合は、例えばU底プレートでは1/12000(0.0083%)、培地量が少ないハンギングドロップ法でも1/2400(0.042%)と非常に低い。一方、MC培地を用いた方法では、吐出した細胞懸濁液に含まれるECMのほとんどがスフェロイド内部に充填されるため、寄与の割合はほぼ100%となる。ECMは高価なものが多く、生検したヒト組織などから抽出したECMなどは大量には得られない。これらの事例を考えると、ECMを効率よく活用できる我々の技術の重要性は明白である。

ECMは組織や臓器ごとに組成や含有量が異なることはすでに述べたが、疾病の発症や進行によっても変化することがある。肝硬変はコラーゲンの異常な蓄積によって生じ、肝細胞の機能が低下する。興味深いことに、肝硬変となったラット肝臓から機能が低下した肝細胞を単離し、正常なラット肝臓に細胞移植すると、肝細胞は増殖・再生して正常な機能を発揮することが報告されている<sup>11)</sup>。ECMが産み出す“微小環境”によって、細胞機能が大きく影響を受けることを示す一例である。ECMと細胞との関係性を生体内と同様に3次元環境下で再現することは重要である。任意の種類および量のECMをスフェロイドに充填できる我々の技術は、ECMと細胞機能との相関を解析するために適している。

## 1 型糖尿病モデル膵島の作製

膵臓は外分泌細胞と内分泌細胞から構成されている。膵臓の大部分を占める外分泌細胞は、腸管に分泌される消化液をつくっている。一方、内分泌細胞は膵臓内に小さな島状のクラスターをつくって点在しており、血糖値を調整するインスリンなどのホル

モンを血液中に分泌している。膵島は $\alpha$ 細胞、 $\beta$ 細胞、 $\delta$ 細胞、PP細胞といった細胞が集合したものであり、インスリンは $\beta$ 細胞が分泌するホルモンである。糖尿病はインスリン機能が低下することで血糖値が上昇し、様々な病状が生じる疾患であり、インスリン機能が低下する原因によって二つの型に大別される。一つめは今回取り上げる1型であり、自己免疫疾患により $\beta$ 細胞が破壊されてしまうため、体内でインスリンをつくることができなくなる。もう一つの2型はインスリンをつくることはできるが、末梢組織でのインスリン応答性が低下することによって発症する。

近年、1型糖尿病に罹患すると、膵島内部にECMの一種であるヒアルロン酸が蓄積することが報告された<sup>12)</sup>。また、ヒアルロン酸の蓄積を抑制すると、1型糖尿病の発病を防げることも報告されている<sup>13)</sup>。ヒアルロン酸は炎症との関連性が深く、免疫細胞を活性化させることで $\beta$ 細胞が攻撃を受け、病態が進行すると考えられている<sup>14)</sup>。1型糖尿病は進行に時間がかかるケースがあり<sup>15)</sup>、その際にはヒアルロン酸は炎症の惹起による間接的な $\beta$ 細胞破壊だけでなく、直接的に $\beta$ 細胞の機能を阻害している可能性もある。しかし、実験動物を使った系では免疫細胞やその他の要因が及ぼす影響を完全に除外することが困難であり、ヒアルロン酸が直接的に $\beta$ 細胞に与える効果だけを厳密に調査することが困難であった。そこで我々は、1型糖尿病モデル膵島を作製することによって、ヒアルロン酸のインスリン分泌活性に対する影響について調査することとした。

図3に示したような流れで、コラゲナーゼ処理によって健康なマウス膵臓から膵島を単離し、1日間の回復培養の後に状態のよい膵島だけをハンドピックし、トリプシン処理を行うことで単一細胞まで分散された膵島細胞を得た。次にMC培地によって膵島細胞とヒアルロン酸(スフェロイドあたり $0.1\mu\text{g}$ )とを凝集・濃縮させることで、ヒアルロン酸を内部に充填した膵島細胞からなるスフェロイド、すなわ

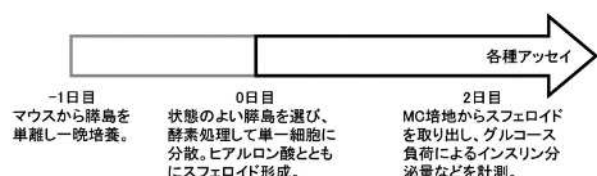


図3 1型糖尿病モデル膵島の作製とアッセイの流れ

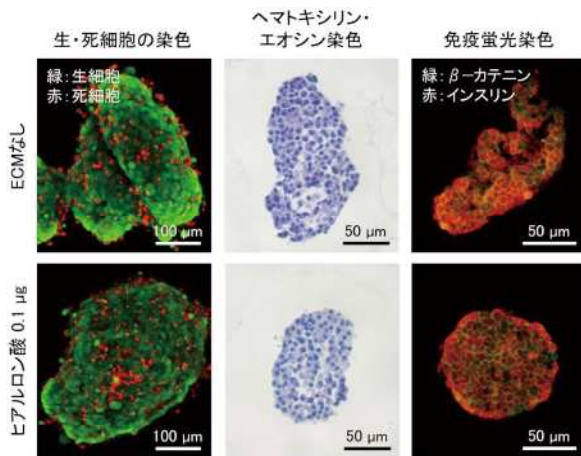


図4 1型糖尿病モデル膵島の細胞生存率と細胞接着の様子

ち1型糖尿病モデル膵島を作製した。ヒアルロン酸の充填によって極端な細胞死や形態変化、細胞間接着の阻害が生じていないことを、生細胞・死細胞を区別する染色やヘマトキシリン・エオシン染色、細胞間接着分子の免疫蛍光染色によって確認した(図4)。ヒアルロン酸を充填した1型糖尿病モデル膵島は、ヒアルロン酸を充填していない再構築膵島と比べて顕著な違いは認められなかった。

続いてグルコース依存的なインスリン分泌活性を計測した。計測に際しては、低グルコース濃度の無血清培地でスフェロイドを30分間培養し、その後高グルコース培地で15分間培養して、培地中に放出されるC-ペプチドをEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法によって計測するという方法をとった。C-ペプチドはβ細胞内にあるインスリン顆粒でプロインスリンが成熟したインスリンに分解される際、インスリンと等量生産される“副産物”である。β細胞のインスリン分泌活性を評価する際に、培地中のインスリンを直接定量することは避けるべきである。なぜなら細胞は培地中のインスリンを取り込んだのちに、再分泌することがあるためである<sup>16)</sup>。C-ペプチドの分泌はプロインスリンから生成された正味のインスリン分泌を意味する。計測の結果、グルコース依存的なインスリン分泌活性は、ヒアルロン酸の充填によって半分まで低下するということが明らかとなった(図5)。グルコース依存的なインスリン分泌活性は、グルコース負荷ののちに細胞内のATP濃度やCa<sup>2+</sup>濃度が上昇することによって生じる<sup>17)</sup>。そこで、ヒアルロン酸の充填によってグルコース負荷によるATP濃

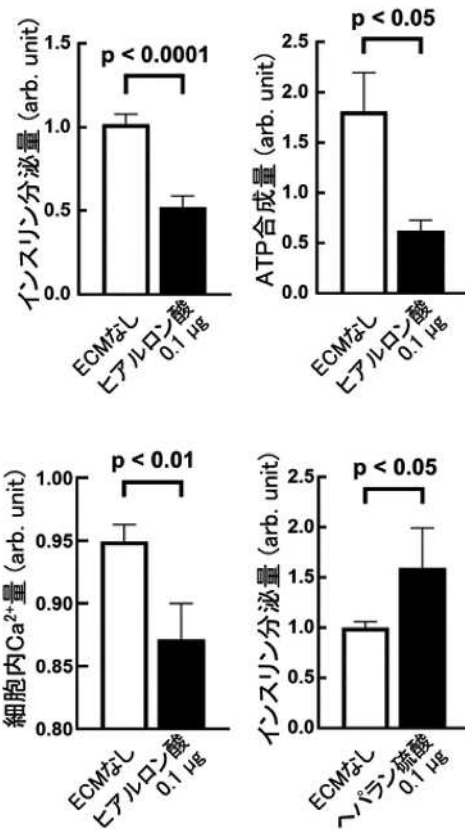


図5 グルコース負荷時の1型糖尿病モデル膵島の応答

度やCa<sup>2+</sup>濃度にどのような影響があるかを調べたところ、双方ともにグルコース依存的な濃度上昇が抑制されていることがわかった(図5)。細胞の表面にはヒアルロン酸に特異的な複数の受容体が発現していることが知られている。本研究の結果は、実際の膵島においてもヒアルロン酸に起因するシグナル伝達によってグルコース負荷に対するATP、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が抑制され、インスリン分泌活性が低下する可能性を示唆している。

ここまでの実験では対照実験としてECMが存在しない条件を設定したが、どんな多糖類を充填してもインスリン分泌活性が下がってしまう可能性について検討する必要がある。そこでヒアルロン酸に構造が似た異なる多糖類をスフェロイドに充填した際の影響を調べた。実は、正常な膵島内部にはヒアルロン酸によく似た多糖類であるヘパラン硫酸が存在し、1型糖尿病罹患時には量が減少する<sup>18,19)</sup>。つまり膵島において、ヘパラン硫酸はヒアルロン酸とは全く逆の変動パターンを示す。そこで、ヘパラン硫酸を充填した膵島細胞スフェロイドを作製し、グル

コース依存的なインスリン分泌活性への影響を調べたところ、ヘパラン硫酸の充填によってグルコース依存的なインスリン分泌活性が向上することが明らかとなった (図5)。生体内でのこれらの多糖類の働きや疾病への関与については、さらなる検証が必要ではある。しかし、多糖類などのECMが作り出す微小環境が細胞の働きを制御するという事実は、少なくともMPSなど試験管内におけるスフェロイド利用に際して十分に活用されるべきである。

### おわりに

本稿では、MC培地を用いたスフェロイドのデザイン技術、特にECMを充填する手法による1型糖尿病モデル膵島の作製技術について紹介した。臓器や組織を構成するECMは、疾患だけでなく加齢によっても変化する。本技術を活用して細胞とECMとを任意に組み合わせることによって、細胞だけでは再現できない様々な状態のモデル臓器をつくり出すことが可能であろう。また、自然界に存在するECMだけでなく、人工的にデザインした高分子タンパク質や多糖類を組み合わせることで、生体由来のECMでは決して得られない細胞機能を誘導することも可能かもしれない。スフェロイドをデザインする技術は、その大量生産技術や凍結保存技術などと併せて、幅広い産業を活性化させる可能性を秘めている。

### 参考文献

- Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., Ingber, D. E.: Reconstituting organ-level lung functions on a chip, *Science*, **328**, 1662-8 (2010).
- Matsumoto, S., Safitri, A. R., Danoy, M., Maekawa, T., Kinoshita, H., Shinohara, M., Sakai, Y., Fujii, T., Leclerc, E.: Investigation of the hepatic respiration and liver zonation on rat hepatocytes using an integrated oxygen biosensor in a microscale device, *Biotechnol. Prog.*, **35**, e2854 (2019).
- Wang, Y. I., Carmona, C., Hickman, J. J., Shuler, M. L.: Multiorgan Microphysiological Systems for Drug Development: Strategies, Advances, and Challenges, *Adv. Healthc. Mater.*, **7**, 1701000 (2018).
- Kojima, N., Takeuchi, S., Sakai, Y.: Rapid aggregation of heterogeneous cells and multiple-sized microspheres in methylcellulose medium, *Biomaterials*, **33**, 4508-14 (2012).
- Tao, F., Mihara, H., Kojima, N.: Generation of Hepatic Tissue Structures Using Multicellular Spheroid Culture, *Methods Mol. Biol.*, **1905**, 157-65 (2019).
- Sayo, K., Aoki, S., Kojima, N.: Fabrication of bone marrow-like tissue in vitro from dispersed-state bone marrow cells, *Regen. Ther.*, **3**, 32-7 (2016).
- Kojima, N., Takeuchi, S., Sakai, Y.: Fabrication of microchannel networks in multicellular spheroids, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **198**, 249-54 (2014).
- De Franceschi, N., Hamidi, H., Alanko, J., Sahgal, P., Ivaska, J.: Integrin traffic-the update, *J. Cell Sci.*, **128**, 839-52 (2015).
- Kechagia, J. Z., Ivaska, J., Roca-Cusachs, P.: Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 457-73 (2019).
- Tao, F., Sayo, K., Sugimoto, K., Aoki, S., Kojima, N.: Development of a tunable method to generate various three-dimensional microstructures by replenishing macromolecules such as extracellular matrix components and polysaccharides, *Sci. Rep.*, **10**, 6567 (2020).
- Liu, L., Yannam, G. R., Nishikawa, T., Yamamoto, T., Basma, H., Ito, R., Nagaya, M., Dutta-Moscato, J., Stolz, D. B., Duan, F., Kaestner, K. H., Vodovotz, Y., Soto-Gutierrez, A., Fox, I. J.: The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis, *Hepatology*, **55**, 1529-39 (2012).
- Hull, R. L., Bogdani, M., Nagy, N., Johnson, P. Y., Wight, T. N.: Hyaluronan: A Mediator of Islet Dysfunction and Destruction in Diabetes?, *J. Histochem. Cytochem.*, **63**, 592-603 (2015).

- 13) Nagy, N., Kaber, G., Johnson, P. Y., Gebe, J. A., Preisinger, A., Falk, B. A., Sunkari, V. G., Gooden, M. D., Vernon, R. B., Bogdani, M., Kuipers, H. F., Day, A. J., Campbell, D. J., Wight, T. N., Bollyky, P. L.: Inhibition of hyaluronan synthesis restores immune tolerance during autoimmune insulinitis, *J. Clin. Invest.*, **125**, 3928-40 (2015).
- 14) Bollyky, P. L., Bogdani, M., Bollyky, J. B., Hull, R. L., Wight, T. N.: The role of hyaluronan and the extracellular matrix in islet inflammation and immune regulation, *Curr. Diab. Rep.*, **12**, 471-80 (2012).
- 15) Nishimura, A., Matsumura, K., Kikuno, S., Nagasawa, K., Okubo, M., Mori, Y., Kobayashi, T.: Slowly Progressive Type 1 Diabetes Mellitus: Current Knowledge And Future Perspectives, *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **12**, 2461-77 (2019).
- 16) Hansson, M., Tønning, A., Frandsen, U., Petri, A., Rajagopal, J., Englund, M. C., Heller, R. S., Hakansson, J., Fleckner, J., Skold, H. N., Melton, D., Semb, H., Serup, P.: Artificial insulin release from differentiated embryonic stem cells, *Diabetes*, **53**, 2603-9 (2004).
- 17) Henquin, J. C.: Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose, *Diabetes*, **49**, 1751-60 (2000).
- 18) Ziolkowski, A. F., Popp, S. K., Freeman, C., Parish, C. R., Simeonovic, C. J.: Heparan sulfate and heparanase play key roles in mouse beta cell survival and autoimmune diabetes, *J. Clin. Invest.*, **122**, 132-41 (2012).
- 19) Simeonovic, C. J., Popp, S. K., Starrs, L. M., Brown, D. J., Ziolkowski, A. F., Ludwig, B., Bornstein, S. R., Wilson, J. D., Pugliese, A., Kay, T. W. H., Thomas, H. E., Loudovaris, T., Choong, F. J., Freeman, C., Parish, C. R.: Loss of intra-islet heparan sulfate is a highly sensitive marker of type 1 diabetes progression in humans, *PLoS One*, **13**, e0191360 (2018).

